
患者由来 iPS 細胞とゲノム編集技術を用いて、 BH4 代謝病のドパミン合成異常の疾患モデル系構築に成功

-iPS 細胞利用による代謝改善生理活性物質の同定と疾患再定義-

ポイント

- BH4 代謝病^{注1)}の患者さん由来iPS細胞とゲノム編集技術を用いて、ドパミン合成異常を示すモデルを構築した。
- BH4 代謝病患者さん由来iPS細胞から作製したドパミン神経は、生理活性物質セピアプテリン^{注2)}投与で、ドパミン^{注3)}合成異常が改善した。
- セピアプテリンは、ドパミン合成量が減少することが知られているパーキンソン病患者さん由来 iPS 細胞から作製したドパミン神経のドパミン合成を改善した。
- iPS 細胞利用により判明した Rare Disease (患者数の少ない疾患) の知見から Common Disease (患者数の多い疾患) の病態を改善する生理活性物質を同定し、iPS 細胞による疾患再定義を行った。

1. 要旨

石川泰三研究員(CiRA・大日本住友製薬株式会社)および井上治久教授(CiRA)らの研究グループは、患者さん由来の iPS 細胞を用いて、BH4 代謝病におけるドパミン合成異常の再現と、その遺伝学的および薬理的修復に成功しました。

ドパミンを合成する為にはチロシンヒドロキシラーゼ (TH) という酵素が必要ですが、TH によるドパミン合成にはさらにテトラヒドロbioプテリン (BH4) が必要となります。研究グループは、BH4 の合成やリサイクルに関わる酵素である 6-ピルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素 (PTPS) やジヒドロプテリジン還元酵素 (DHPR) に変異のある患者さんから iPS 細胞をつくり、ゲノム編集技術^{注4)} (CRISPR/Cas9 システム) を用いて遺伝子を修復した正常な iPS 細胞を用意しました。それらの iPS 細胞をドパミン神経へと分化させたところ、PTPS 欠損の患者さん由来神経細胞では BH4 の量、TH タンパク質レベル、ドパミン合成レベルが減少しているという表現型を示しました。そこで、BH4 前駆物質セピアプテリンを添加したところ、PTPS 欠損ドパミン神経細胞で見られるそれらの表現型が改善されました。さらに、セピアプテリン投与で、ドパミン量が減少することが知られているパーキンソン病患者さん由来 iPS 細胞から作製したドパミン神経の合成するドパミン量が改善しました。これらの結果から、BH4 代謝病の患者さん由来の iPS 細胞はドパミン合成異常を示す疾患のその異常を改善する生理活性物質や治療薬のスクリーニングに利用可能であることが分かると同時に、BH4 代謝病とパーキンソン病は異なる疾患ですが、それぞれの患者さんの iPS 細胞由来ドパミン神経を用いて、ドパミン合成を改善する共通の生理活性物質を同定し、iPS 細胞を利用して、ともに共通の生理活性物質が iPS 細胞由来神経細胞のドパミン合成を改善する疾患であると、疾患再定義をしました。

この研究成果は 2016 年 10 月 18 日 (英国時間) に「Human Molecular Genetics」でオンライン公開されました。

2. 研究の背景

ドパミンは脳内の神経伝達物質の一種で、BH4 代謝病やパーキンソン病を含むいくつかの疾患で中心的な役割を果たしています。ドパミンを合成する経路の中で、律速段階となっているのがチロシンヒドロキシラーゼ (TH) による反応ですが、その TH の反応には BH4 が必要となります。そのため、BH4 の合成やリサイクルがうまくできなくなると、ドパミン合成が異常になり、運動障害を含め様々な症状をきたします。BH4 の合成に関わる PTPS という酵素や、BH4 のリサイクルに関わる DHPR という酵素をコードする遺伝

子に変異が入ると、BH4 の代謝異常がおきます(Fig. 1)。BH4 代謝異常や BH4 の代謝についてはこれまでも研究がされていましたが、BH4 の合成やリサイクルに関わる遺伝子の変化が患者さんの脳の中でのようにしてドパミン合成の異常をおこすのかは分かっていませんでした。

3. 研究結果

1. 遺伝的に同質なコントロール細胞の作製

遺伝子変異(変化)によりPTPSやDHPRが欠損している患者さんの末梢血^{注5)}から、iPS細胞を作製しました。そこからドパミン(DA)神経へと誘導することで、BH4 代謝病患者さんのモデル神経細胞を作りました。また、iPS細胞の段階で原因となっている遺伝子変異を、ゲノム編集技術により修復し、ドパミン神経へと誘導し、患者さんと遺伝子情報が変異箇所を除いて同じであるコントロール細胞を作りました(Fig. 2)

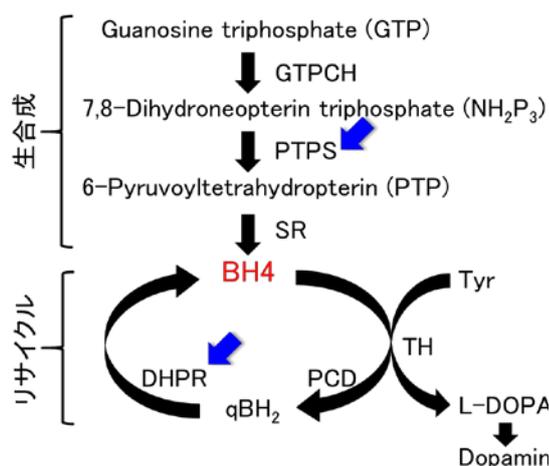


Fig.1 BH4 の生合成とリサイクル

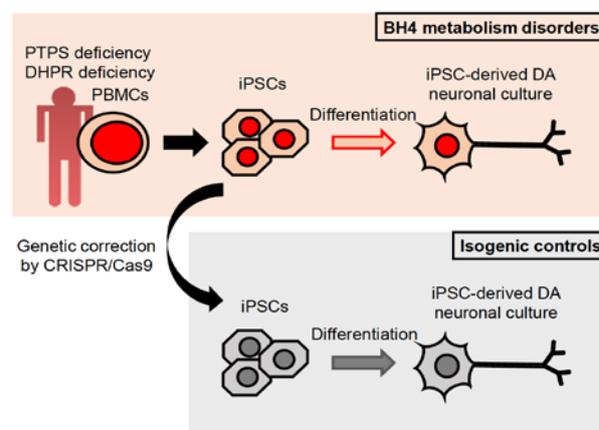


Fig. 2 患者さん由来 iPS 細胞を用いて BH4 代謝異常のドパミン神経に対する影響を探る方法

2. THタンパク質量や合成されるドパミン量が患者さん由来iPS細胞から作製した神経細胞では減少した。

PTPS を欠損した患者さんのモデル神経細胞と遺伝子修復した神経細胞とを比較したところ、神経細胞の量はどちらも同じくらいであるにも関わらず、BH4 の量、TH タンパク質の量、合成されるドパミンレベルが患者さんのモデル神経細胞の方で減少していました(Fig. 3)。一方、DHPR を欠損した患者さんのモデル神経細胞では BH4 の量が減少しておらず、かわりに BH4 酸化物である BH2 が増加していました(Fig. 4)。このことから両変異遺伝子でドパミン量減少をきたす機序に差異があることが示唆されました。

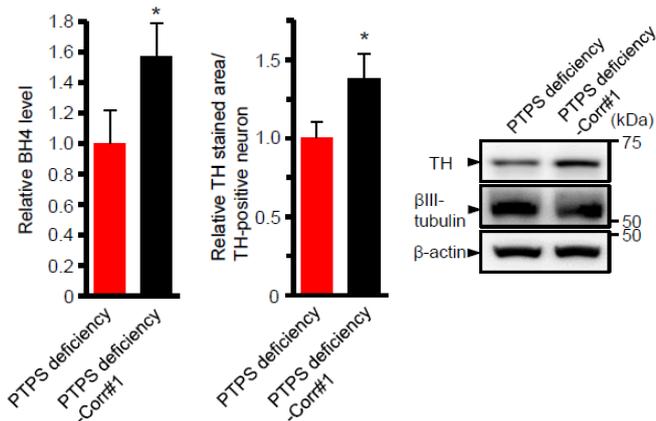


Fig. 3 PTPS 変異 BH4 代謝病の患者さん由来のドパミン細胞での BH4 量、TH タンパク質、ドパミン合成レベル
 左から BH4 の量、TH 発現面積、TH タンパク質の量、ドパミン合成レベルをそれぞれ表している。いずれも遺伝子修復をしていない患者さんモデル神経細胞の方が低くなっている。

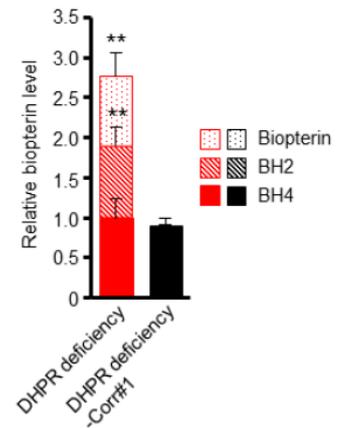


Fig.4 DHPR 変異 BH4 代謝病患者さん由来のドパミン神経細胞での BH4 量
 BH4 の量に変化が見られない。

3. セピアプテリン投与によるドパミン合成の改善

PTPS 変異 BH4 代謝病の患者さんモデル神経細胞に、BH4 あるいは BH4 の前駆物質であるセピアプテリンを作用させると、TH タンパク質の量およびドパミン合成レベルが増加しました(Fig. 5)。

ドパミン合成異常があるパーキンソン病の患者さんモデル神経細胞にセピアプテリンを作用させたところ、同様に TH タンパク質量の増加、ドパミン合成レベルの増加を確認できました(Fig. 6)。

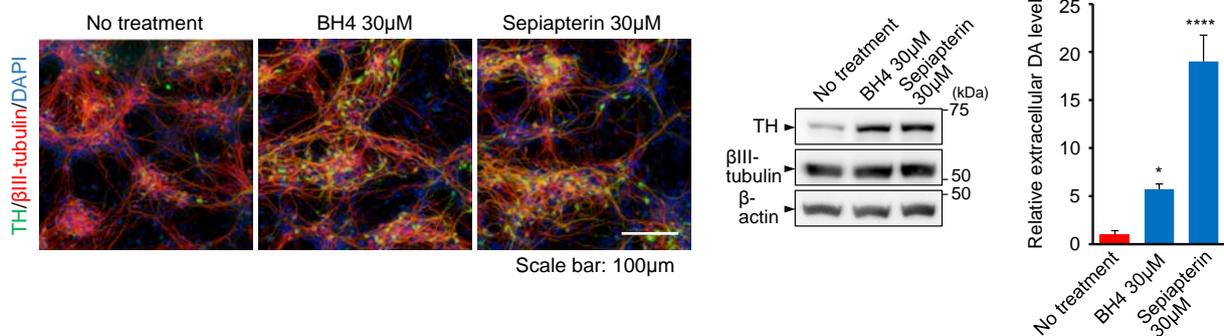


Fig. 5 セピアプテリンを作用させた際の TH タンパク質やドパミン合成

左から iPS 細胞から分化させた神経細胞、TH タンパク質、ドパミン合成レベルをそれぞれ表している。BH4 あるいはセピアプテリンの添加により TH タンパク質やドパミンレベルが増加している。

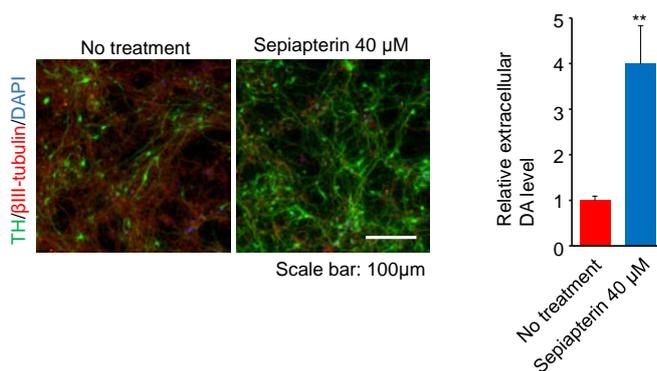


Fig. 6 パーキンソン病患者さんモデル神経細胞におけるセピアプテリンの効果

左から iPS 細胞から分化させたドパミン神経細胞、ドパミン合成レベル。セピアプテリンの添加により、TH の発現強度、ドパミンレベルが増加している。

4. まとめ

上記研究成果は、BH4を合成する酵素の遺伝子変異がBH4代謝病のドーパミン合成に影響を与えている事と、セピアプテリンがBH4代謝病患者さん由来iPS細胞より分化したドーパミン細胞のドーパミン合成異常の改善に有用である事を示すものです。

BH4代謝病の患者さん由来のiPS細胞はドーパミン合成異常を示す疾患のドーパミン合成を改善する生理活性物質や治療薬のスクリーニングに利用可能であることが分ると同時に、iPS細胞利用により判明したRare Diseaseの知見からCommon Diseaseの病態を改善する生理活性物質を同定しました。

5. 論文名と著者

○ 論文名

“Genetic and pharmacological correction of aberrant dopamine synthesis using patient iPSCs with BH4 metabolism disorders”

○ ジャーナル名

Human Molecular Genetics

○ 著者

Taizo Ishikawa^{1,2}, Keiko Imamura¹, Takayuki Kondo¹, Yasushi Koshiba^{1,3}, Satoshi Hara⁴, Hiroshi Ichinose⁴, Mahoko Furujo⁵, Masako Kinoshita⁶, Tomoko Oeda⁶, Jun Takahashi¹, Ryosuke Takahashi³, Haruhisa Inoue^{1,*}

○ 著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)
2. 大日本住友製薬
3. 京都大学大学院医学研究科
4. 東京工業大学生命理工学院
5. 国立病院機構 岡山医療センター
6. 国立病院機構 宇多野病院

6. 本研究への支援

本研究は、下記機関より資金的支援を受けて実施されました。

- AMED 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究」
- AMED 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 「iPS 細胞研究中核拠点」
- AMED 難治性疾患実用化研究事業
- 持田記念医学薬学振興財団
- 第一三共生命科学振興財団

7. 用語説明

注 1) BH4 代謝病 (ビオプテリン代謝異常症)

テトラヒドロビオプテリン (BH4) の先天的な代謝異常によりおきる遺伝性疾患。BH4 代謝の異常により、神経伝達物質の低下による重篤な中枢神経障害がおこる。PTPS 欠損の患者さんは世界で 300 名 (日本で 32 名)、DHPR 欠損の患者さんは世界で 200 名 (日本で 5 名) と報告されている。

注 2) セピアプテリン

BH4(テトラヒドロbioプテリン)の前駆物質でもある生理活性物質。

注 3) ドパミン (ドーパミン)

中枢神経系での神経伝達物質の1つ。運動調節、ホルモン調節、意欲、学習などに関わるとされる。フェニルアラニンやチロシンというアミノ酸に TH が作用することで前駆物質である L-ドーパが作られ、その L-ドーパからドパミンが合成される。

注 4) ゲノム編集技術

細胞の中にある遺伝情報を、必要に応じて酵素を使って切り貼りして編集をする技術。幾つかの方法があるが、最近では CRISPR/Cas9 システムがよく用いられている。

注 5) 末梢血

通常の体を巡っている血液のこと。臓器中にプールされている血液やさい帯血と区別するために使われる。